

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



**INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA PRELIMINAR
COMPARATIVA ENTRE O LEITE PASTEURIZADO E
O LEITE UHT COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO/RJ**

Graduando: Fagner Luiz de Amorim Cabral
DRE:112059113

Orientador: Prof. Marcoaurélio Almenara Rodrigues (Ph. D.)

Rio de Janeiro
2015

Fagner Luiz de Amorim Cabral

**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA PRELIMINAR
COMPARATIVA ENTRE O LEITE PASTEURIZADO E
O LEITE UHT COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO/RJ**

Monografia apresentada junto ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito final para a obtenção de grau em Bacharelado em Química.

Orientador: Prof. Marcoaurélio Almenara Rodrigues (Ph. D.)

Rio de Janeiro
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

Fagner Luiz de Amorim Cabral

**ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA PRELIMINAR
COMPARATIVA ENTRE O LEITE PASTEURIZADO E
O LEITE UHT COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO/RJ**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Marcoaurélio Almenara Rodrigues (Ph. D.), Instituto de Química/UFRJ
(Orientador)

Prof^a. Lúcia Moreira Campos Paiva (Ph. D.), Instituto de Química/UFRJ

Prof^a. Anita Ferreira Valle (Ph. D.), Instituto de Química/UFRJ

Rio de Janeiro - RJ
Fevereiro de 2015

A todos que de alguma forma me ajudaram
a tornar este momento uma realidade

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe pelo esforço incondicional de me proporcionar carinho e dedicação ao longo desta jornada.
- Aos amigos que obtive durante o curso, que batalharam junto comigo nos melhores e nos piores obstáculos.
- Especialmente a minha esposa Ariane, por estar presente neste momento tão importante.
- Ao orientador Marcoaurélio pela paciência e dedicação ao trabalho.

RESUMO

O leite é um dos alimentos mais consumidos no mundo e sua manufatura evoluiu com o passar dos anos, consequentemente diversos mitos sobre a qualidade dos diversos tipos de leite que são fabricados no Brasil, foram propagados na população. No presente trabalho foram levantadas evidências de mitos e verdades sobre a qualidade do leite, mostrando a percepção que a população acaba tendo perante esse alimento. Foram feitas avaliações físico-químicas comparativas preliminar do tempo de conservação entre o leite pasteurizado fervido, não fervido e o leite UHT de 3 marcas de leite UHT e de 3 marcas de leite pasteurizado comercializados na região metropolitana do Rio de Janeiro/RJ. Os resultados mostraram que a avaliações físico-químicas comparativas entre os dois tipos de leite estão de acordo com a Instrução Normativa Nº 62/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e que os resultados físico-químicos do tempo de conservação ao longo das horas, do leite UHT e pasteurizado fervido, não apresentaram alterações na qualidade. Porém a qualidade físico-química do leite pasteurizado não fervido apresentou alteração quanto ao passar do tempo após aberto. Uma vez que na literatura, a qualidade físico-química está diretamente relacionada com a qualidade microbiana, concluiu-se que os leites UHT e pasteurizados fervidos apresentaram qualidade microbiana superiores ao leite pasteurizado não fervido. O presente trabalho evidenciou que tanto o leite pasteurizado como o leite UHT são seguros para consumo se seguidas as normas vigentes, porém o leite pasteurizado ainda deve ser fervido para o consumo pois o tempo de armazenamento do leite pasteurizado não fervido é inferior ao fervido.

Palavras-chave: Saúde Humana, qualidade do leite, Microbiana, físico-química, mitos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A HISTÓRIA DO LEITE	1
1.1.1 O aperfeiçoamento das técnicas de manufatura do leite a partir do séc. XIX	1
1.1.2 A produção do leite no Brasil	3
1.2 O MERCADO DE LEITE NO BRASIL E SUAS INFLUÊNCIAS NA PERCEPÇÃO POPULAR SOBRE A QUALIDADE DE CADA TIPO DE LEITE	6
1.2.1 O mercado de leite no Brasil	6
1.2.2 Leite UHT x Pasteurizado	8
1.3 A QUALIDADE MICROBIANA DO LEITE	10
1.3.1 Aspectos da qualidade microbiana do leite	10
1.3.2 Avaliação da qualidade microbiana do leite	13
1.4 A QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE	18
1.4.1 Aspectos da qualidade físico-química do leite	18
1.4.2 Avaliação da qualidade físico-química do leite	21
2 OBJETIVO	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 AMOSTRAS DE LEITE UTILIZADAS	24
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	24
3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	24
3.3.1 Índice de acidez	25
3.3.2 Análise de pH	25
3.3.3 Densidade a 15°C	26
3.3.4 Teor de água	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	32
BIBLIOGRAFIA	33
ANEXO 1	37
ANEXO 2	41
ANEXO 3	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 A HISTÓRIA DO LEITE

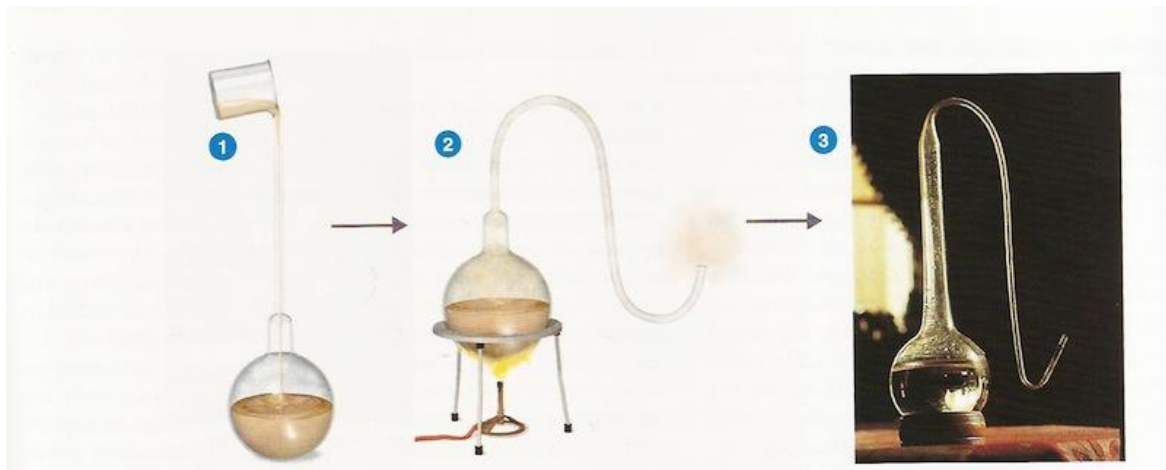
A origem do leite para o consumo humano tem como partida o momento em que o homem começou a domesticar e criar animais. O povo Mesopotâmico, que data de aproximadamente 8.000 A.C., já tentava domesticar animais que produziam leite, provavelmente para o consumo, e no Mediterrâneo, na idade do bronze, existiram as “sociedades agrícolas” mais antigas que se tem conhecimento. (Parmalat, 2008)

O leite mais consumido pelos antepassados eram os de cabras, ovelhas e mulas, mas a partir do surgimento da civilização romana o leite de vaca foi introduzido na alimentação, tendo um importante papel na história, pois os Romanos aperfeiçoaram as técnicas para trabalhar com o leite e seus derivados, alavancando o consumo em todo o seu império (Parmalat, 2008)

1.1.1 O aperfeiçoamento das técnicas de manufatura do leite a partir do séc. XIX

Em 1865, um grupo de mercadores franceses, com o intuito de evitar a deterioração do vinho e da cerveja que azedavam quando enviadas a longas distâncias, pediram ao químico e microbiologista francês Louis Pasteur que desenvolvesse um método para prolongar a validade dessas bebidas. Pasteur descobriu que o azedamento e a deterioração eram causados por organismos diferentes chamados bactérias, e a solução para o problema da deterioração foi o aquecimento das bebidas o suficiente para matar a maioria das bactérias que causavam o estrago. Esta técnica foi batizada em sua homenagem como pasteurização (Figura 1). Já em 1886, o químico alemão Franz von Soxhlet propôs que o princípio da pasteurização fosse empregada ao leite, com o objetivo de eliminar os microrganismos, prolongando a qualidade e a validade do leite para o transporte em longas distâncias. A pasteurização do leite garantia a eliminação, assim como no vinho e na cerveja, de microrganismos patogênicos e suas toxinas, reduzindo o ambiente microbiano e mantendo as propriedades nutricionais do leite. Muitas bactérias relativamente resistentes sobrevivem ao calor da pasteurização,

mas tem pouca probabilidade de causar doença ou deteriorar o leite (Tortora *et al*, 2012).



Fonte: Tortora *et al*. (2012)

Figura 1 - O experimento de pasteurização de Pasteur

- 1 – Primeiramente Pasteur colocou caldo de carne dentro de um frasco de pescoço longo;
- 2 – Em seguida, ele aqueceu o pescoço do frasco, o curvou no formato de S e ferveu o caldo de carne por vários minutos;
- 3 – Os microrganismos não apareceram na solução resfriada mesmo em longos períodos, como é possível ver nesta fotografia recente de um frasco utilizado por Pasteur em um exemplo similar.

De 1920 em diante, quantidades significativas de leite pasteurizado já eram produzidas e comercializadas em garrafas de vidro, e se mantiveram assim por algumas décadas. A partir de 1943, o sueco Dr. Ruben Rausing iniciou o estudo para se desenvolver uma embalagem para o leite que exigiria um mínimo de material, mais resistente que o vidro e que ao mesmo tempo ofereceria o máximo de higiene. Em 18 de maio de 1951, foi apresentado para o mundo pela empresa sueca recém criada por Dr. Ruben Rausing, a Tetra Pak, o novo sistema de envase em embalagens cartonadas de formato tetraédrico, que inicialmente embalava creme de leite, mas que nos anos posteriores vieram a embalar o leite pasteurizado. Até então o leite embalado nessas novas caixas era o mesmo que vinham nas garrafas de vidro, mas no ano de 1961 a Parmalat, empresa Italiana fundada na província de Parma por Calisto Tanzi, foi a pioneira no envase asséptico do leite nas embalagens da Tetra Pak, surgindo o chamado leite UHT (ultra high temperature) (Tetra Pak, 2013).

O leite UHT, também conhecido como leite longa vida, introduzido pela Parmalat, nada mais é que a esterilização do leite que, diferentemente da pasteurização, é tratado com temperatura ultraelevada, chegando a 150°C com o

uso de vapor de água por até 4 segundos e posteriormente resfriado para 18°C rapidamente, podendo assim ser armazenado por muitos meses e sem qualquer tipo de refrigeração, sendo especialmente útil em regiões menos desenvolvidas, onde condições apropriadas de refrigeração nem sempre estão disponíveis (Tortora *et al*, 2012).

1.1.2 A produção do leite no Brasil

Atualmente no Brasil dois tipos de leite são produzidos e comercializados legalmente, que são os leites pasteurizado e o UHT.

Nos leites pasteurizados, que na maioria dos processos de pasteurização utilizam o método chamado HTST (High-temperature, short-time), consiste em utilizar uma temperatura de 72°C a 75°C durante 15 a 20 segundos. Este tratamento mata os microrganismos patogênicos e diminui as contagens bacterianas totais podendo ser bem conservado sob refrigeração (Tortora *et al*, 2012). Até o final do ano de 2002 existiam três tipos leites pasteurizados, o tipo A, B e C. Basicamente, a diferença entre eles consistia nos diferentes graus de exigências de higiene na ordenha e no transporte, e no grau de certeza de sua procedência.

O beneficiamento do leite cru e do tipo A, B e C seguia a Instrução Normativa nº 51 (IN 51), de 18/09/2002, que rege os aspectos referentes à produção, identidade e qualidade do leite cru e pasteurizado tipo A, B e C. Nesta Instrução Normativa, estava prevista uma diminuição gradual ao longo dos anos até 2012, quanto ao limite máximo tolerável de microrganismo, dando prazo para que os produtores se adequassem à legislação; porém os produtores não conseguiram se adequar a tempo, e com isso foi decidido que a Instrução Normativa Nº 62 (IN 62), de 29/12/2011, substituiria a Instrução Normativa Nº 51 (IN 51). A IN 62 pois fim a divisão do leite tipo B e tipo C denominando as duas apenas como leite cru pasteurizado e acrescentou em mais cinco anos o prazo para que os produtores de leite se adequassem à nova legislação (Brasil, 2011).

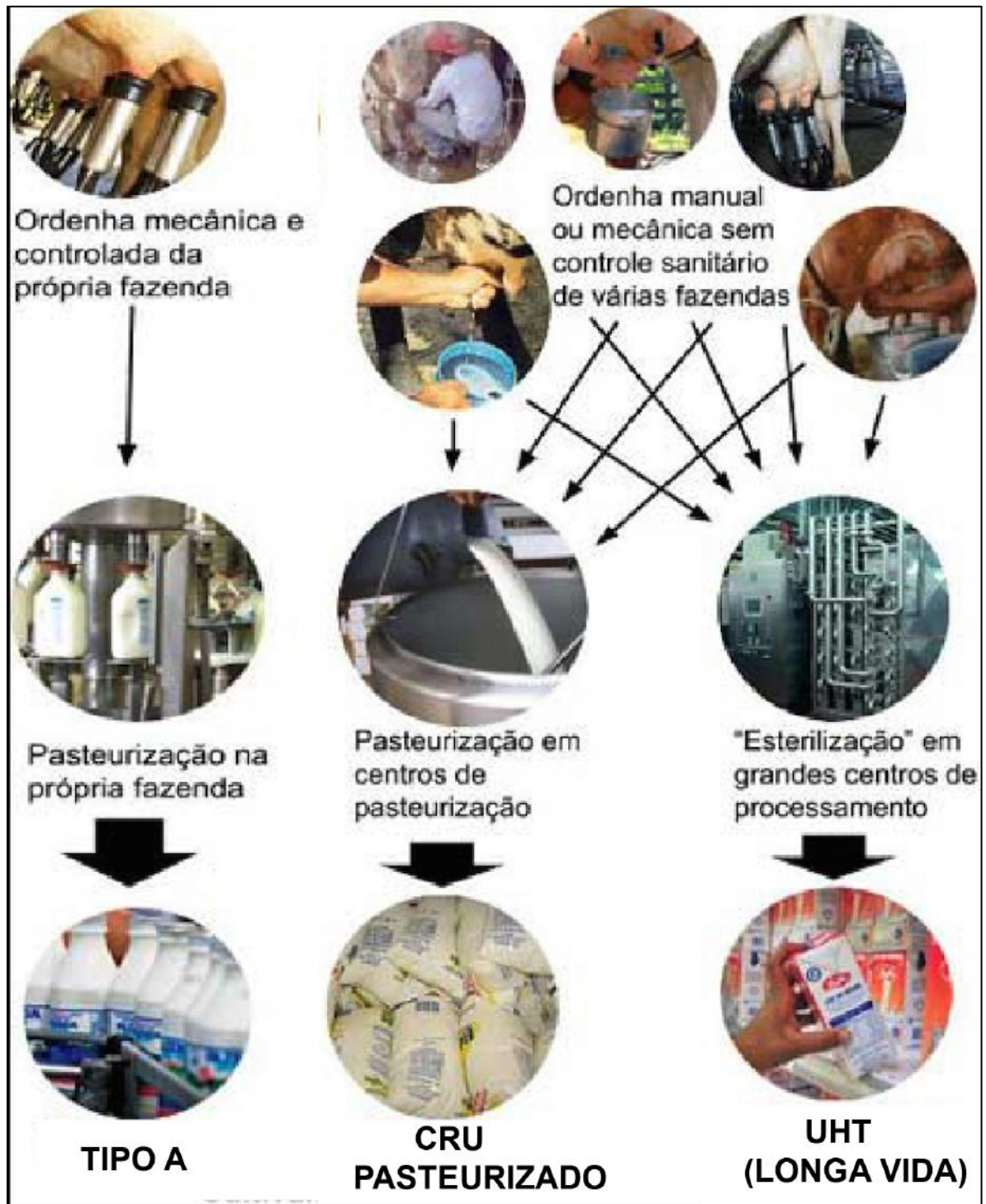
No leite do “tipo A”, a ordenha é feita de forma mecânica em circuito fechado, pasteurizado imediatamente e armazenado sob refrigeração a 4°C no mesmo estabelecimento de onde foi ordenhado, posteriormente ele é distribuído em veículos frigoríficos aos pontos de vendas na temperatura de até 7°C. É um tipo de leite totalmente rastreado e por isso se torna caro e menos comum nas prateleiras.

O leite cru pasteurizado, que substituiu os leites tipo B e C, segue um procedimento parecido com o leite do tipo A, a diferença está na pasteurização que é feita em centros de pasteurização, que recebem o leite cru que foi refrigerado por expansão direta (serpentinhas onde expande um fluido refrigerante, absorvendo calor e arrefecendo o leite na qual é refrigerado pelo contato direto com elas) até 4°C, ou imersos em latões de água gelada em até 7°C de produtores que armazenam ou não em tanques comunitários. A refrigeração deve ocorrer em até 3 horas após a ordenha, manual ou mecânica, e o tempo máximo de conservação do leite até o transporte para os centros de beneficiamentos é de no máximo de 48 horas. É comum que os centros de pasteurização realize testes no ato do recebimento para garantir uma qualidade mínima do leite, já que a ordenha e o transporte podem vir de diferentes fornecedores. (Brasil, 2011)

Geralmente este tipo de leite é comercializado em sacos plásticos, que o torna um pouco mais barato e acessível à população, principalmente de classes sociais com poder aquisitivo inferior, diferentemente dos leites do tipo A que são comercializados geralmente em garrafas PET, tornando-o mais caros.

O leite chamado UHT, segue a portaria N° 370, de 04/09/1997, que rege o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (BRASIL, 1997) e tem a mesma origem do leite do cru pasteurizado, ou seja, de várias ordenhas diferentes, mas neste caso, que diferentemente da pasteurização, ele é esterilizado em temperatura entre 130°C e 150°C durante 2 a 4 segundos, rapidamente resfriado a uma temperatura inferior a 18°C em câmara de vácuo e então empacotado sob condições assépticas em embalagens cartonadas hermética e pré-esterilizada. Este tratamento garante a quase totalidade da eliminação de microrganismos presentes no leite, e assim podendo ser armazenado por vários meses sem refrigeração (Tortora *et al*, 2012; Brasil, 1997).

Um resumo gráfico mostrando o caminho desde a ordenha até o produto final encontra-se na figura 2.



Fonte: Adaptação de Cultivando (2011)
 Figura 2 - Resumo gráfico dos tipos de leite

1.2 O MERCADO DE LEITE NO BRASIL E SUAS INFLUÊNCIAS NA PERCEPÇÃO POPULAR SOBRE A QUALIDADE DE CADA TIPO DE LEITE

1.2.1 O Mercado de leite no Brasil

Nos anos 80, o leite pasteurizado tipo B e C eram líderes do mercado consumidor nacional nas regiões metropolitanas, onde os produtores locais de cada região produziam o leite para a distribuição no entorno, devido à sua curta validade. Com a chegada do leite UHT ao mercado nacional, o panorama começou a mudar, tanto que entre 1990-2002 o consumo de leite UHT aumentou cerca de 30% ao ano e em 2008 respondeu por 76% de todo o leite fluído consumido pela população e 47% de todo o leite consumido no Brasil, incluído os leites em pó, segundo a ABLV (Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida). Entre os fatores que elevaram esse percentual está na praticidade da compra, que na maioria das grandes redes de supermercados é o único tipo de leite fluído vendido, seu grande tempo de estocagem com embalagem fechada, que pode chegar a 6 meses, a embalagem cartonada que torna muito mais seguro e prático o armazenamento, e o marketing bem feito na mídia em combate ao leite pasteurizado (ABLV, 2014).

Esse prazo de validade de 6 meses do leite UHT, provocou uma mudança no perfil do fabricante de leite no país; como o leite pasteurizado tem prazo de validade curto e deve ser sempre mantido em refrigeração, os pequenos produtores locais abasteciam o comércio da região, mas o leite UHT podia ser transportado por milhares de quilômetros de distância e ser fabricado em maior escala. Um bom exemplo é a presença de leite UHT importado da França no mercado brasileiro, como mostra a figura 3. Com isso as grandes produtoras de leite expandiram as bacias leiteiras de regiões produtoras, como as dos Centro-Oeste e Norte do país, e assim, extinguiu o produtor local de leite cru devido à grande competitividade de preço, oferta de disponibilidade no mercado e ao grande investimento de marketing na mídia (Rubez, 2003).



Fonte: Milkpoint (2013)

Figura 3 - Leite UHT importado da França vendido no Brasil

Hoje o leite pasteurizado comercializado em sacos plásticos atende apenas a pequenos laticínios por marcas regionais ou a uma pequena parcela da rede varejista, que tendem a oferecer uma maior variedade de produtos ao consumidor e muitas vezes mais cara. (Rubez, 2003)

Vale ressaltar que o Leite não-pasteurizado (leite cru) não é recomendado pela ANVISA para o consumo direto pela população devido ao risco da vaca leiteira possuir mastite bovina, que é a inflamação da glândula mamária, e ao alto grau de contaminação por bactérias devido à baixa assepsia e higiene na ordenha, embora seja possível encontrar comércio ilegal em cidades pequenas do interior. Atualmente não existe mais uma estatística sobre a venda legal do leite cru para o consumidor, mas um estudo realizado em 2004, constatou que 60% dos indivíduos entrevistados que afirmaram que consomem leite cru, o fazem devido ao acreditar ser um produto natural e assim conter mais nutrientes e ser mais “forte”, e outros 24% por ser mais barato e de fácil acesso. (Nero, 2005)

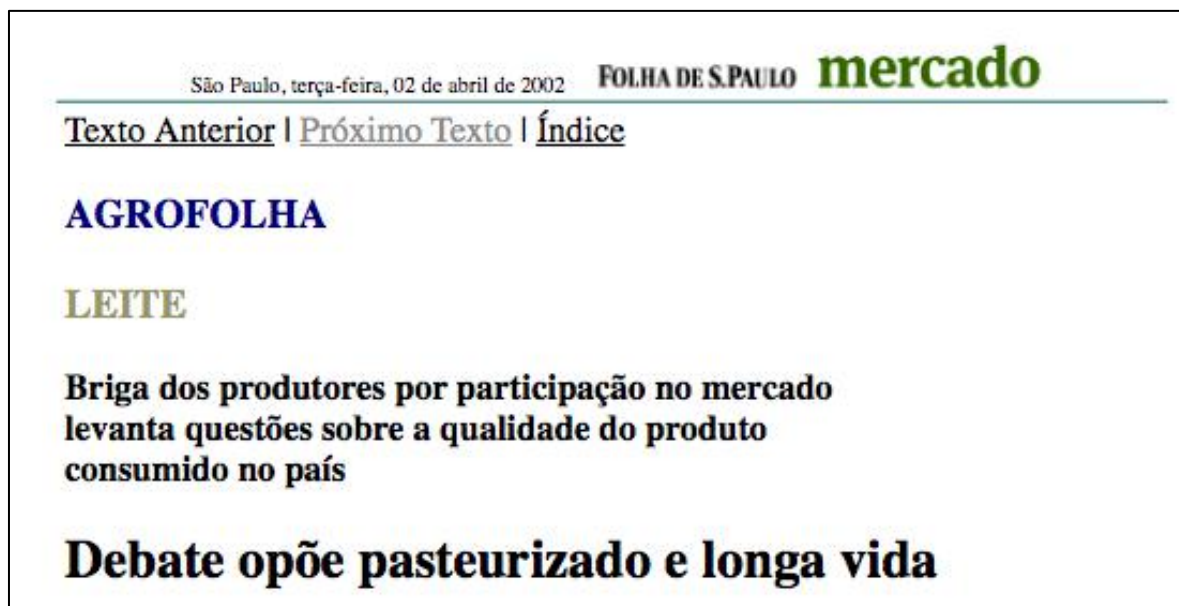
Hoje o leite cru somente é comercializado legalmente para as indústrias de manufatura de leite e para algumas indústrias de produtos de origem leiteira, como manteigas, sorvetes e iogurtes.

1.2.2 Leite UHT x Pasteurizado

Essa mudança do perfil do consumidor fez com que ocorresse um embate entre os produtores de leite UHT e pasteurizado, já que a expansão do mercado e das vendas do leite UHT cresceram vertiginosamente. O grande debate que existe desde 2002 é sobre a qualidade final do leite UHT em comparação ao leite cru pasteurizado, que hoje é praticamente o único leite pasteurizado ainda comercializado no Brasil. Segundo o *site* da Milkpoint (2014), devido à baixa procura e à Instrução Normativa Nº 62 (IN 62) (Brasil, 2011), substituindo a IN 51 (Brasil, 2002), muitos produtores não conseguem produzir o leite tipo A com preço competitivo e com a qualidade exigida, que ficou mais rigorosa desde a publicação da IN 62, e hoje praticamente não existe mais produção de leite tipo A e assim o foco se tornou o leite cru pasteurizado.

Essa troca de preferencia do consumidor pelo tipo de leite fez com que as indústrias produtoras e comerciantes do leite cru pasteurizado, com a intenção de combater a concorrência, propagasse uma grande quantidade de desinformações sobre os tipos de leite disponíveis no mercado, com isso, diversos tipos de mitos sobre a qualidade de cada um está bastante difundido na população, o que acabam por deturpar os conhecimentos científicos já adquiridos. Os produtores e comerciantes de leite usam da internet e mídia impressa para divulgarem esses mitos sobre os benefícios e malefícios do leite manufaturado, seja o produtor do pasteurizado se referindo ao UHT e vice-versa.

Como mostra na figura 4, uma notícia publicada no jornal on-line Folha de S.Paulo, caderno Agrofolha, no dia 02 de abril de 2002, os produtores de leite brigam desde 2002 por participação no mercado levantando questões sobre a qualidade do produto consumido no país.



Fonte: Folha (2002)

Figura 4 - Reprodução de notícia do jornal Folha de S.Paulo

Segundo a notícia do jornal Folha de S.Paulo, o principal argumento da ABILP (Associação Brasileira das Indústrias de Leite Pasteurizado) é que o leite UHT, em seu processo de manufatura na indústria, perde valor nutricional, como perda das vitaminas C e B6 e também elimina os lactobacilos, que são microrganismos importantes para o bom funcionamento da flora intestinal, a ABILP alega também que a matéria-prima utilizada é de má qualidade, provenientes de fazendas leiteiras com baixo custo, com padrões de produção menos rigorosos e sem o controle necessário de ordenha e transporte, e que também é adicionado citrato de sódio para garantir a durabilidade do leite. Em contra partida, o argumento utilizado pela Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV) é que as perdas do processo de ultrapasteurização (UHT) não são relevantes e a perda de vitaminas e lactobacilos causada pelo processo não é significativa devido ao fato de o leite não ser considerado fonte desses tipos de nutrientes, como disse a Daniela Rodrigues Alves, veterinária e gerente de informação ao consumidor da ABLV (Folha, 2002).

“O leite é considerado fonte de outras coisas, como cálcio e proteínas. A perda de vitaminas e lactobacilos não é importante” (Daniela Alves da ABLV)

De fato, outros alimentos são mais ricos em vitaminas e lactobacilos, como o iogurte, leite fermentado e alguns tipos de queijos, com isso, o leite UHT, de acordo

com a ABLV, possui essencialmente o mesmo nível de determinadas vitaminas da matéria-prima (leite cru) que é submetida a pasteurização ou ao tratamento UHT, ou seja, goza de todas as vantagens do leite pasteurizado. Quanto ao citrato de sódio, a ABLV afirma que a substância está presente naturalmente no leite e que a adição apenas repõe perdas decorrentes do processo (Folha, 2002).

No leite UHT é permitida pela portaria Nº 370/1997 do MAPA, a adição de estabilizantes citrato e fosfatos (monofosfato, difosfato e trifosfato) de sódio, separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1%. As adições desses estabilizantes aumentam a estabilidade térmica, pois o leite UHT é armazenado sem refrigeração e precisa resistir a coagulação pelo calor, assim se tornam essenciais ao leite UHT. Os estabilizantes tem o efeito de sequestrar o cálcio iônico e agir na redução do fosfato de cálcio coloidal no leite, formado durante o tratamento UHT, que desloca o cálcio e o fosfato solúveis para a fase coloidal, diminuindo a solubilidade da proteína do soro e a quebra da lactose em ácidos orgânicos (Wastra e Jenness, 1984).

O citrato e os fosfatos basicamente são repostos ao leite pela perda do processo UHT, ou seja, não devem possuir concentrações muito diferentes do contido no leite pasteurizado e nem apresentam qualquer tipo de intolerância ou indigestão à saúde humana para quem consome o leite UHT com esses estabilizantes.

1.3 A QUALIDADE MICROBIANA DO LEITE

1.3.1 Aspectos da qualidade microbiana do leite

O leite é um alimento rico em nutrientes, como vitaminas, proteínas, gorduras, sais minerais e carboidratos e com isso, torna-se um alimento de extrema importância para a dieta humana, mas também pelas mesmas características, o leite se torna um ambiente muito favorável para o crescimento de muitos microrganismos o tornando um produto extremamente perecível. Esses microrganismos são provenientes da qualidade geral do manejo e higiene adotados nas fazendas produtoras durante a ordenha do leite, tais como, falta de higiene do ordenhador, dos utensílios utilizados no momento da ordenha, como o recipiente de armazenagem e o tubo de coleta, bem como da falta de higiene e saúde da vaca

leiteira. Os microrganismos também podem advir da infraestrutura ruim de transporte e armazenagem à frio até as indústrias de manufatura. As condições de higiene e qualidade na ordenha são de extrema importância para se obter elevada qualidade microbiana na obtenção do leite cru com o mínimo possível de contaminação (Leite Jr *et al*, 2000; Padilha *et al*, 2001).

Apesar de o leite sofrer processo de pasteurização ou tratamento UHT, a quantidade de microrganismo presente após a pasteurização ou ao tratamento UHT está diretamente relacionada a quantidade de microrganismos presente no leite cru antes do processo, pois a pasteurização elimina mas não esteriliza o alimento, diferentemente do processo UHT que esteriliza, pois quanto maior a contagem de microrganismo antes do processo, maior será após o processo, ou seja, a pasteurização destrói os microrganismos patogênicos mas não recupera um leite de má qualidade (Oliveira, 2006).

O mesmo ocorre na produção do leite UHT que também pode ocorrer contaminação microbiana, ou seja, ele na prática não está livre de microrganismo e pode não sofrer esterilização absoluta, uma vez que se a matéria-prima, o leite cru, possuir bactérias termorresistentes, elas podem permanecer viáveis no leite UHT. Outro fator possível é a não adoção de práticas sanitárias no manuseio de equipamentos e embalagens, tornando a contaminação microbiana possível durante o envase ou a má higienização do equipamento de tratamento térmico (Prata, 1998).

Dentre os microrganismos para referência de indicador de qualidade microbiológica, tem sido utilizado amplamente as bactérias do grupo coliformes. Os coliformes termotolerantes caracterizados pela alta incidência de *Escherichia coli*, são considerados o principal indicador de contaminação fecal e assim indicam que outros agentes patogênicos podem também estar presentes (Silva, 2001). Esta bactéria é a responsável pela diarreia causada por alimentos contaminados. A *Salmonella* spp também pode estar presentes no leite de má qualidade e isto é preocupante, pois pode causar graves intoxicações alimentares (Maciel, 2008). O *Staphylococcus aureus* pode se multiplicar no leite se este não for refrigerado adequadamente. Esta é a bactéria responsável pela mastite bovina, e que se ingerida pelo homem, pode causar intoxicação alimentar devido à formação de enterotoxinas (Borges, 2008).

Para monitorar a qualidade microbiana do leite cru e pasteurizado, o método mais empregado é o de contagem bacteriana total (CBT) ou contagem padrão em

placas (CPP). A CBT ou CPP quantifica o total de microrganismo aeróbios mesófilos que se proliferam quando há inadequação no processo de ordenha e armazenamento, bem como contaminação ou problemas de refrigeração (Nero, 2005).

Para monitorar o estado de saúde das glândulas das vacas leiteiras, é empregado a contagem de células somáticas (CCS), que são constituídas de leucócitos e células epiteliais, que é bastante elevado se a vaca possuir mastite, individualmente ou de um rebanho. Alta contagem de CCS produzem perdas de produções e alteração de componentes individuais do leite (Nero, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa N° 62/2011 (IN 62), as análises devem seguir métodos oficiais padronizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ou outros padrões de métodos de controle operacional, desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação ao respectivos métodos de referência. A IN 62 estabelece que amostras do leite devem ser analisadas mensalmente em laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), que são credenciados, e os resultados enviados para as indústrias, que deverão apresentá-los ao produtor, e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para acompanhar a qualidade do leite na propriedade rural e exigir a resolução de problemas detectados caso ocorra. Os limites máximos padrão permitidos para o leite cru antes do beneficiamento em diversas regiões do Brasil e seus períodos de vigência encontram-se na tabela 1 expressa em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL) e célula somática por mililitro (Células/mL) (Brasil, 2011).

Tabela 1 - Limites máximos de contagem de bactérias totais ou padrão em placas (CBT ou CPP) e contagem de células somáticas (CCS) no leite cru nas regiões Sul (S), Sudeste (SE), Centro Oeste (CO), Norte (N) e Nordeste (NE)

Índice medido (por propriedade rural ou tanque comunitário)	Até 31/12/2011 Regiões: S/SE/CO	De 01/01/2012 até 30/06/2014 Regiões: S/SE/CO	De 01/07/2014 até 30/06/2016 Regiões: S/SE/CO	A partir de 01/07/2016 Regiões: S/SE/CO
	Até 31/12/2012 Regiões: N/NE	De 01/01/2013 até 30/06/2015 Regiões: N/NE	De 01/07/2015 até 30/06/2017 Regiões: N/NE	A partir de 01/07/2017 Regiões: N/NE
CBT ou CPP em UFC/mL	750.000	600.000	300.000	100.000
CCS em Células/mL	750.000	600.000	500.000	400.000

Fonte: Brasil (2011)

É exigida uma (1,0) análise mensal com média geométrica no período de 3 meses, ou seja, a indústria ou o produtor só é notificado se a média geométrica desses 3 meses estiver fora dos parâmetros, e não apenas o resultado de um único mês, assim os produtores e as indústrias têm tempo para tomarem as medidas necessárias a fim de evitarem problemas com o leite e serem interditados (Brasil, 2011).

Os limites máximos de contagem bacteriana e células somáticas diminuem consideravelmente após a pasteurização ou ao tratamento UHT. Também é exigida análises microbianas de contagem de coliformes totais, em incubação entre 30°C e 35°C, coliformes termotolerantes, em incubação a 45°C, e ausência de *Salmonella* spp. As análises, os limites máximos e o número de amostras coletadas por lote exigida encontra-se na tabela 2 (Brasil, 2011).

Tabela 2 - Limites máximos de contagem de bactérias totais ou padrão em placas (CBT ou CPP) em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL), coliformes totais e termotolerantes em número mais provável por mililitro (NMP/mL) e contagem de unidades de *Salmonella* spp por 25 mililitro.

Requisitos de análise	Leite Pasteurizado	Leite UHT
CBT ou CPP em UFC/mL	n=5; c=2; m=40.000 e M=80.000	n=5; c=0; m=100
Coliformes totais em NMP/100mL	n=5; c=2; m=200 e M=400	*
Coliformes termotolerantes em NMP/100mL	n=5; c=1; m=100 e M=200	*
<i>Salmonella</i> spp/25mL (consertar)	n=5; c=2; m=ausência	*

* Não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.

n= Número de amostragem de um mesmo lote

c= Número máximo de amostras que podem estar entre m e M.

m= Máximo aceitável

M= Máximo tolerável

Fonte: Brasil (2011)

1.3.2 Avaliação da qualidade microbiana do leite

Em 2010, Luz *et al.* (2010) fez uma avaliação microbiana em leite cru e pasteurizado de produtores do Alto Pantanal Sul-Mato Grossense (Veja metodologia no anexo 1). Avaliou-se leite pasteurizado de laticínios oriundos de produtores de Mato Grosso do Sul, leite cru de produtores legalizados dos municípios de

Aquidauana/MS e Anastácio/MS e de produtores que vendem de maneira informal pelas ruas.

Os resultados obtidos por Luz *et al.* (2010) mostraram que o todas as amostras de leite cru oriundos de produtores legalizados e todas as amostras de leite pasteurizado comprado em estabelecimentos comerciais apresentaram contagem de células somáticas (CSS) dentro dos padrões determinados pela Instrução Normativa Nº 62/2011, evidenciando que as vacas leiteiras apresentam sinais que estão com saúde e sem evidências de mastite; porém 50% das amostras de leite cru comprado de forma informal pelas ruas, apresentaram resultado fora de especificação, conforme a legislação vigente na época da pesquisa, assim, ratificando que a ordenha em vacas que não possuem cuidados com a saúde, como vacinação, boa alimentação e exames periódicos, são suscetíveis a desenvolverem infecções mamárias, conforme mostra a tabela 3.

O presente estudo de Luz *et al.* (2010) mostrou também que a contagem bacteriana total (CBT) das amostras de leite pasteurizado e do leite cru obtidos de produtores legalizados, apresentaram resultados de CBT dentro das especificações de ordenha, armazenamento e higiene conforme a legislação vigente na época, por outro lado, 50% das amostras de leite cru obtido de maneira informal estavam acima da especificação, ou seja, sem o cumprimento da norma para a ordenha de qualidade, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 3 - Contagem de células somáticas por mililitro (CCS/mL). Os resultados fora de especificação estão destacados em vermelho.

Amostra	CCS/mL de leite pasteurizado	CCS/mL de leite cru formal	CCS/mL de leite cru informal
01	< 100.000	< 100.000	750.000
02	< 100.000	130.000	410.000
03	< 100.000	170.000	300.000
04	< 100.000	150.000	1.000.000
05	< 100.000	150.000	310.000
06	< 100.000	250.000	1.420.000
07	< 100.000	< 100.000	1.840.000
08	< 100.000	< 100.000	1.000.000
09	< 100.000	< 100.000	800.000
10	< 100.000	< 100.000	600.000

Fonte: Luz *et al.* (2010)

Tabela 4 - Contagem bacteriana total expressa em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL). Os resultados fora de especificação estão destacados em vermelho.

Amostra	UFC/mL de leite pasteurizado	UFC/mL de leite cru formal	UFC/mL de leite cru informal
01	85.000	506.000	1.157.000
02	25.000	311.000	848.000
03	25.000	335.000	976.000
04	87.000	135.000	143.000
05	25.000	724.000	1.217.000
06	25.000	173.000	940.000
07	25.000	467.000	393.000
08	56.000	317.000	470.000
09	106.000	141.000	536.000
10	25.000	324.000	380.000

Fonte: Luz *et al.* (2010)

Estes resultados mostrados nas tabelas 3 e 4 corroboram o fato de que a legislação imposta assegura a qualidade do leite para o consumidor, evidenciando que o leite comprado de maneira informal apresenta riscos para a saúde humana, desde sinais de mastite nas vacas leiteiras até a contaminação por bactérias por falta de procedimentos mínimos de assepsia, higiene e conservação na ordenha.

O resultado da pesquisa microbiana feita por Luz *et al.* (2010) para coliformes totais e termotolerantes nas amostras de leite pasteurizado, cru formal (legal) e cru informal (ilegal), encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 - Contagem de coliformes totais (CT) e coliformes termotolerantes (Ct) em número mais provável por mililitro (NMP/100mL). Os resultados fora de especificação estão destacados em vermelho.

Amostra	NMP/mL de Leite pasteurizado		NMP/mL de Leite cru formal		NMP/mL de leite cru informal	
	CT	Ct	CT	Ct	CT	Ct
01	< 30	< 30	210	< 30	> 24.000	430
02	240	90	90	90	230	230
03	40	< 30	40	< 30	930	930
04	< 30	< 30	210	210	930	930
05	< 30	< 30	140	< 30	11.000	11.000
06	< 30	< 30	230	70	> 24.000	390
07	90	40	430	430	> 24.000	> 24.000
08	230	90	150	40	> 24.000	> 24.000
09	< 30	< 30	< 30	< 30	> 24.000	> 24.000
10	< 30	< 30	210	150	11.000	4.600

Fonte: Luz *et al.* (2010)

Nestes ensaios, os resultados da tabela 5 evidenciaram que 100% das amostras de leite pasteurizado e 90% das amostras de leite cru formal estavam de acordo com a legislação, porém quase 100% das amostras de leite cru informal estavam contaminadas com coliformes.

Estes resultados do leite cru informal comprovam que houve falha na cadeia produtiva, como falta de boas práticas de higiene, muito devido à desinformação por parte do produtor sobre os riscos da contaminação e pela falta de fiscalização quanto a ordenha por produtores informais, mostrando que a qualidade microbiana do leite é comprometida com a falta desses cuidados.

A pesquisa de presença de *Salmonella* spp foi feita por Salvador *et al.* (2012) em leite pasteurizado comprado em supermercados, padarias e mercearias da cidade de Apucarana/PR (Veja metodologia no anexo 2). Foram adquiridas amostras de seis marcas conhecidas de leite pasteurizado produzidas e envasadas na região.

Os resultados para *Salmonella* spp feita por Salvador *et al.* (2012) encontra-se na tabela 6. Todas as amostras apresentaram ausência deste microrganismo, mostrando que o processo de pasteurização foi eficiente. Isto ratifica a importância do processo de pasteurização para a sua total eliminação e para a segurança alimentar.

Tabela 6 - Presença de *Salmonella* spp/25mL

Amostra	<i>Salmonella</i> spp/25mL
01	Ausência
02	Ausência
03	Ausência
04	Ausência
05	Ausência
06	Ausência

Fonte: Salvador *et al.* (2012)

Entre algumas avaliações microbianas já realizadas por outros autores estão as de Coelho *et al.* (2001), onde foram analisadas 80 amostras de leite UHT integral de oito marcas comercializadas em Belo Horizonte/MG entre janeiro e abril de 1999; Bersot *et al.* (2005), onde foram analisadas 150 amostras de leite UHT integral de três marcas comercializadas em Palotina/PR entre outubro de 2004 e fevereiro de 2005, e os de Vidal-Martins *et al.* (2005), onde foram analisadas 110 amostras de leite UHT integral de 11 marcas nacionais diferentes comercializadas em São José do Rio Preto/SP entre junho e dezembro de 2000. Seguindo a portaria Nº 370 de 04/09/1997, Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (BRASIL, 1997), foram realizadas contagens de bactérias mesófilas aeróbicas em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL) após a incubação em embalagem fechada entre 35 e 37°C por 7 dias. (BRASIL, 2011).

Os resultados das análises de Bersot *et al.* (2005) e Vidal-Martins *et al.* (2005) mostram uma melhoria na qualidade microbiana do leite, com a redução do limite imposto pela legislação, em relação aos resultados da pesquisa feita por Coelho *et al.* (2001), como mostra a tabela 7.

Tabela 7 - Resultados em UFC/mL encontrados pelos 3 autores nas análises microbianas de amostras de leite UHT estudadas. Os resultados fora de especificação estão destacados em vermelho.

Coelho <i>et al.</i> (2001) UFC/mL de Leite UHT			Bersot <i>et al.</i> (2005) UFC/mL de Leite UHT			Vidal-Martins <i>et al.</i> (2005) UFC/mL de leite UHT		
5 amostras por marca	Bom	Ruim	25 amostras por marca	Bom	Ruim	10 Amostras por marca divididas em lotes 1 e 2	Bom	Ruim
01	0	5	X	22	3	A 1	5	0
						A 2	2	3
02	2	3	Y	25	0	B 1	5	0
						B 2	4	1
03	5	0	Z	9	16	C 1	5	0
						C 2	0	5
04	1	4	% total	74,7	25,3	D 1	5	0
						D 2	3	2
05	5	0	% Aprovado	66,6	33,3	E 1	5	0
						E 2	4	1
06	1	4				F 1	5	0
						F 2	0	5
07	4	1				G 1	5	0
						G 2	5	0
08	5	0				H 1	5	0
						H 2	4	1
% Total	57,5	42,5				I 1	0	5
						I 2	4	1
% Aprovado	37,5	62,5				J 1	5	0
						J 2	5	0
						K 1	5	0
						K 2	4	1
						% Total	77,3	22,2
						% Aprovado	59,0	41,0

1.4 A QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE

1.4.1 Aspectos da qualidade físico-química do leite

O leite de vaca é composto basicamente de água, gordura, lactose, proteínas e sais minerais. A proteína do leite é um constituinte importante para a dieta humana, pois é absorvida pelo organismo e utilizada para a construção de proteínas do corpo

humano. Dos 20 aminoácidos padrão, 8 são essenciais, ou seja, não podem ser sintetizados pelo corpo humano e todos estão presentes no leite. As gorduras e a lactose, que só é encontrada no leite, são importantes fontes de energia para a dieta. (Tetra Pak, 2013)

A composição do leite pode variar em função da espécie, raça, alimentação, estação do ano e período de lactação do animal, mas de uma maneira geral o leite bovino possui concentrações médias de constituintes estabelecidas.

Tabela 8 - Composição média do leite de vaca

Constituinte	Teor % (m/m)
Água	87,3
Gordura	3,9
Proteínas	3,25
Lactose	4,6
Minerais	0,65
Sólidos totais	12,7
Sólidos não gordurosos	8,8

Fonte: Paula *et al.* (2010)

A IN N° 62/2011 estabelece os requisitos físico-químicos que o leite cru deve apresentar na propriedade rural onde é ordenhado e o pasteurizado após o beneficiamento na indústria; e a portaria N° 370/1997 estabelece os requisitos físico-químicos que o leite UHT deve apresentar após o tratamento como mostra a tabela 9. Além de possuir aspecto e cor límpido branco opalescente homogêneo e ser isento de sabores e odores considerados estranhos, o leite deve ser comercializado com ausência de neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade, fosfatase alcalina, peroxidase, inibidores de crescimento microbiano ou qualquer tipo de composto que adultere a qualidade do leite ou iniba uma possível degradação. A IN N° 62/2011 proíbe a realização de padronização de desnate na propriedade rural (Brasil, 2011).

Tabela 9 - Requisitos físico-químicos do leite cru, pasteurizado e UHT

Requisitos		Limites		
Gordura no leite cru (%)		Mínimo de 3,0		
Gordura no leite pasteurizado e UHT (%)	Integral 3,0	Semi desnatado 0,6 a 2,9	Desnatado < 0,6	
Densidade a 15°C		1,028 a 1.034		
Acidez titulável (% de ácido láctico)		0,14 a 0,18		
Extrato seco desengordurado (%)	Integral Mín. 8,2	Semi desnatado Mín. 8,3	Desnatado Mín. 8,4	
Índice crioscópico		-0,512°C a -0,531°C		
Proteínas (%)		Mínimo de 2,9		
Estabilidade ao Alizarol* 72% (cru e pasteurizado) 68% (UHT)		Estável		

* Alizarol = etanol 68% ou 72% com corante vermelho Alizarina 2% em etanol
Fonte: Brasil (2011)

As propriedades físico-químicas do leite podem ser avaliadas e indicar aspectos de qualidade e evidências de possível adulteração no leite. Direta ou indiretamente, estes aspectos afetam o nível de aceitação e capacidade de processamento do produto (Fonseca *et al*, 2000).

Da mesma forma como acontece com as análises microbianas, a Instrução Normativa Nº 62/2011 rege que as análises físico-químicas também devem seguir métodos oficiais padronizados pela MAPA ou outros padrões de métodos de controle operacional, desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação ao respectivos métodos de referência.

A densidade, que é determinada pela concentração de sólidos não gordurosos e pelo teor de gordura, e a crioscopia do leite, podem indicar que houve adição de água se a densidade tiver abaixo do especificado e o índice crioscópico tiver um valor mais próximo de 0°C, pois o leite por possuir uma série de substâncias dissolvidas, tem o ponto de congelamento inferior ao da água (Santos, 2004).

O pH é levemente ácido, variando entre 6,6 e 6,8, devido à presença de dióxido de carbono, proteínas, fosfato, citrato e lactato (Santos, 2004).

A acidez titulável do ácido láctico é um dos mais importantes testes físico-químicos no leite, pois tem como objetivo detectar aumentos na concentração natural do ácido láctico. O possível aumento na concentração de ácido láctico é devido

à fermentação da lactose por bactérias, e consequentemente, pode indicar contaminação microbiana, na ordenha ou no armazenamento inadequado, com a degradação do leite com o passar do tempo (Fonseca *et al.*, 2000).

O teste do Alizarol 72% (etanol 72% com alizarina 2%) simula a estabilidade do leite ao aquecimento. Este teste também é capaz de prever aumentos na concentração de ácido láctico devido à fermentação, pois desestabiliza a proteína do leite e forma coágulos ao reagir com o álcool 72% (Santos, 2004).

1.4.2 Avaliação da qualidade físico-química do leite

Em agosto de 2010, Paula *et al.* (2010) avaliaram 20 amostras de leite cru provenientes de várias propriedades leiteiras da região Sul Fluminense. Os leites foram amostrados de acordo com a IN N° 62/2011 diretamente dos carros-tanques que transportam o leite cru refrigerado para a indústria de beneficiamento.

Foram realizadas análises de acidez titulável, estabilidade ao Alizarol 72%, resíduos de antibióticos, ponto de congelamento (crioscopia), percentual de gordura, pH, densidade a 15°C, extrato seco total (EST) com disco de Ackermann e extrato seco desengordurado (ESD) por meio de cálculos matemáticos, pesquisa de enzimas como a fosfatase e peroxidase, pesquisa de conservantes e reconstituintes como bicarbonatos e outros alcalinos, amido, cloreto, sacarose, peróxido de hidrogênio e formol (veja anexo 3 para metodologia) (Paula *et al.*, 2010).

Os resultados das 20 amostras analisadas por Paula *et al.* (2010) em seu levantamento, todas em triplicatas, estão descritas na tabela 10 com valores médios e suas variações de amplitude. Paula *et al.* (2010) não detectaram a presença de nenhum conservante ou produtos químicos geralmente utilizadas pra fraudar o leite, assim evidenciando que a qualidade do leite analisado está de acordo com a legislação vigente na época da pesquisa.

Tabela 10 - Resultado médio das análises do leite cru

Análises	Média	Mínimo	Máximo	Amplitude	Desvio padrão
Acidez (%)	15,1	15,0	16,0	1,0	0,3078
Crioscopia (°C)	-0,521	-0,529	-0,516	0,013	0,0037
Gordura (%)	3,38	3,20	3,60	0,40	0,1293
pH	6,7	6,7	6,8	0,10	0,2750
Densidade (15°C)	1,031	1,031	1,031	0,00	0,0000
E.S.T. (%)	12,05	11,790	12,33	0,54	0,1478
E.S.D. (%)	8,68	8,59	8,73	0,14	0,0353
Antibiótico	-	-	-	-	-
Fosfatase	+	+	+	+	+
Peroxidase	+	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	-
Alcalino	-	-	-	-	-
Cloreto	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-
Peróxido de H	-	-	-	-	-
Formol	-	-	-	-	-
Alizarol	-	-	-	-	-

Fonte: Paula *et al.* (2010)

Com todas essas evidências mostradas, o leite é um alimento importante para ser estudado e comparado, devido à sua popularidade no país, ao seu alto valor nutritivo à sua grande demanda de venda e consumo, e principalmente à desinformação que existe em torno desse alimento, que acaba por influenciar na escolha e na compra por parte do consumidor.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo:

1 - Realizar análises físico-químicas preliminar comparativa de 2 tipos de leite comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro/RJ, a fim de se estabelecer quais são os diferenças e semelhanças na qualidade físico-química deles.

2 - Estabelecer o tempo de armazenamento (prateleira) que o leite cru pasteurizado e o leite UHT mantém suas características físico-químicas próprias para o consumo em uma prazo máximo de 96 horas, conforme recomendação contidas nas embalagens pelos fabricantes.

3 - Fornecer orientações e informações sobre a qualidade do leite pasteurizado e do leite UHT disponíveis no mercado, ajudando a identificar e entender alguns componentes existentes e a diferença de manufatura entre eles, inserindo-os no cotidiano da população e mostrando os reais riscos e os mitos existentes, e os cuidados que se deve ter no armazenamento entre os tipos de leites disponíveis no mercado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE LEITE UTILIZADAS

Em dezembro de 2014, foi realizado um levantamento para se determinar o tempo de conservação, também conhecido como tempo de prateleira, do leite pasteurizado fervido e não fervido, e do leite UHT na geladeira comum, com temperaturas abaixo dos 10°C. Foram comprados no supermercado Carrefour do bairro de Sulacap no Rio de Janeiro/RJ, 3 caixas de leite UHT das marcas Nestlé, Elegê e Carrefour; no bairro de Curicica/RJ foram comprados em padarias, 2 sacos de leites pasteurizados das marcas Clarice e Boa Nova, produzidas no município de Valença/RJ; e no bairro da Barra da Tijuca/RJ, foi comprado no supermercado Zona Sul, uma garrafa de leite pasteurizado da marca Vitalatte, também produzida no município de Valença/RJ. No total se utilizou de 6 marcas de leite diferentes, sendo 3 de leite UHT e 3 de leite pasteurizado.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os leites pasteurizados das 3 marcas foram separados em duas partes iguais e uma dessas partes foi fervida por 2 minutos em fogo doméstico, utilizando um recipiente de 1000 mL. A outra parte foi mantida resfriada em geladeira e assim, totalizando 9 amostras para análises.

Os prazos de armazenamento para as análises foram de zero (abertura da embalagem), 24, 48, 72 e 96 horas depois de abertas, sendo sempre guardadas em geladeira em temperaturas abaixo de 10°C, conforme recomendação dos fabricantes de leite que estão contidos nas embalagens. Os prazos contidos nas embalagens são geralmente de consumo em até 48 horas, porém este prazo foi ampliado para os testes físico-químicos.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Tendo em mãos 9 amostras de leite, foram feitas análises físico-químicas em dias diferentes após a abertura das embalagens. Foram feitas análises de índice de acidez por titulação, análise de pH, densidade a 15°C e teor de água.

3.3.1 Índice de acidez

As análises de índice de acidez, que é o percentual de ácido láctico presente no leite, foram feitas utilizando uma solução de Hidróxido de Sódio na concentração 0,1 Molar (NaOH 0,1M), solução indicadora de Fenolftaleína 1% em etanol e um titulador automático da empresa Mettler Toledo modelo DL53 (Figura 5). Foram pesadas nos copos de titulação massas conhecidas das amostras de leite, adicionadas 4 gotas de fenolftaleína e tituladas com NaOH 0,1M no titulador automático.

O resultado foi obtido através da formula: % de ácido láctico (m/m) = $(V \times f \times 0,09 \times N \times 100) / m$; onde: V= volume de NaOH 0,1M utilizado; f= fator do NaOH 0,1M; 0,09= miliequivalente grama do ácido láctico; N= Normalidade do NaOH 0,1M; 100= fator de conversão para % e m= massa de amostra pesada.



Fonte: Mettler Toledo (2015)

Figura 5 – Titulador automático Mettler Toledo DL53

3.3.2 Análise de pH

Para as análises de pH, foi utilizado um pHmetro de bancada da empresa Methrom modelo 827 com eletrodo de vidro combinado. O pH das 9 amostras foi

medido transferindo-as para o bécher de 150 mL cada uma e utilizando posteriormente o pHmetro.

3.3.3 Densidade a 15°C

Na determinação da densidade a 15°C, utilizou-se um balão volumétrico com tampa de 10 mL, termômetro de vidro e uma balança analítica da empresa Mettler Toledo modelo AB-135. As análises da densidade das amostras foram feitas através da pesagem de 10 mL da amostra com o balão volumétrico na balança analítica e obtendo o resultado utilizando a fórmula da densidade $D=M/V$.

3.3.4 Teor de água

A determinação do teor de água das amostras foram feitas utilizando-se um Titulador Karl Fischer modelo 870 KF Titrino da empresa Metrohm (Figura 6), reagente Karl Fischer CombTitrant 5 da empresa Merck, metanol com baixo teor de água e seringa de 100 µL; de acordo com o método sugerido no manual prático de titulação da empresa Methrom (Methrom 2015). Os resultados foram determinados automaticamente pelo titulador com a injeção de 20 µL de amostra diretamente no copo de titulação.



Fonte: Methrom (2015)
Figura 6 – Titulador Karl Fischer Methrom 870 KF Titrino

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de densidade estão apresentados na tabela 11; eles mostram que as amostras não se alteraram ao longo do tempo, se mantendo em média entre 1,031 a 1,033. O leite não apresentou evidências de adulteração com adição de água ou outro componente que altere esta característica, não formou gelo e não apresentou vestígios de algum tipo de precipitação, se mantendo dentro das especificações da IN N° 62/2011. Porém pôde-se evidenciar que o resultado da densidade das amostras de leite pasteurizado fervido aumentou em relação ao resultado do leite não fervido, mostrando que estes resultados são representativos e que existe uma relação da densidade com a perda de água ocorrido durante a fervura, onde o leite fica mais concentrado ao perder água.

Tabela 11 - Densidade (g/mL) das amostras de Leite UHT (1, 2 e 3), pasteurizado não fervido (4, 5 e 6) e fervido (7, 8 e 9) em função do tempo (horas) de armazenamento após a abertura da embalagem. As amostras fervidas foram aquecidas ao ponto de fervura por 2 minutos em fogo doméstico.

Amostras	Tempo de Conservação (h)				
	0	24	48	72	96
1 - Nestlé	1.031	1.031	1.031	1.031	1.031
2 - Elegê	1.032	1.032	1.032	1.032	1.032
3 - Carrefour	1.031	1.031	1,031	1,031	1.031
4 - Vitalatte	1.032	1.032	1.032	1.032	1.032
5 - Clarice	1.032	1.032	1.032	1.032	1.032
6 - Boa Nova	1,032	1,032	1,032	1,032	1,032
7 - Vitalatte (fervido)	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033
8 - Clarice (fervido)	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033
9 - Boa Nova (fervido)	1.033	1.033	1.033	1.033	1.033

O resultados de teor de água das amostras (Tabela 12) também se manteve, em cerca de 87% para o leite UHT e pasteurizado não fervido, e de 85% para os leites pasteurizados fervidos, que perdem cerca de 2% do teor de água durante a fervura, assim evidenciando a característica físico-química esperada, conforme a IN N° 62/2011, para um leite sem adulteração com água.

Tabela 12 – Teor de água (%) das amostras de Leite UHT (1, 2 e 3), pasteurizado não fervido (4, 5 e 6) e fervido (7, 8 e 9) em função do tempo (horas) de armazenamento após a abertura da embalagem. As amostras fervidas foram aquecidas ao ponto de fervura por 2 minutos em fogo doméstico.

Amostras	Tempo de Conservação (h)				
	0	24	48	72	96
1 - Nestlé	87	87	87	87	87
2 - Elegê	87	87	87	87	87
3 - Carrefour	87	87	87	87	87
4 - Vitalatte	87	87	87	87	87
5 - Clarice	87	87	87	87	87
6 - Boa Nova	87	87	87	87	87
7 - Vitalatte (fervido)	85	85	85	85	85
8 - Clarice (fervido)	85	85	85	85	85
9 - Boa Nova (fervido)	85	85	85	85	85

O índice de acidez e análise de pH são análises físico-químicas de extrema importância para esse tipo de levantamento, pois o aumento do índice de acidez, e consequentemente o caimento do valor de pH, nos fornece a informação da degradação do leite por ação de bactérias, que ao longo do tempo de armazenamento, se multiplica e fermenta o leite. Este fenômeno provoca a coagulação das proteínas do leite e a formação do coalho, ou seja, a deterioração do leite aumentando a concentração de ácido láctico (Santos, 2004).

Os valores de pH e o índice de acidez não variaram nas amostras de leite pasteurizado fervido e nas amostras de leite UHT ao longo do tempo de armazenamento, mas nas amostras de leite pasteurizado não fervido apresentaram variações em ambas as análises, evidenciando que o leite pasteurizado quando não fervido está suscetível à degradação por ação de bactérias ao longo do tempo de armazenamento.

Os resultados de pH e índice de acidez mostraram significativamente que após 48 horas após aberto ele começa a se tornar impróprio para o consumo humano e com 96 horas pode-se considerar o leite pasteurizado não fervido impróprio, como mostra o por exemplo o resultado das análises do leite Clarice. Este fato comprova que quando o leite pasteurizado é fervido ele se torna mais resistente

a ação de degradação e mantendo suas características físico-químicas por mais tempo.

Os resultados das variações de índice de acidez encontram-se na tabela 13 e os resultados das variações de pH encontram-se na tabela 14.

Tabela 13 – Índice de acidez (%) das amostras de Leite UHT (1, 2 e 3), pasteurizado não fervido (4, 5 e 6) e fervido (7, 8 e 9) em função do tempo (horas) de armazenamento após a abertura da embalagem. As amostras fervidas foram aquecidas ao ponto de fervura por 2 minutos em fogo doméstico.

Amostras	Tempo de Conservação (h)				
	0	24	48	72	96
1 - Nestlé	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
2 - Elegê	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
3 - Carrefour	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
4 - Vitalatte	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15
5 - Clarice	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18
6 - Boa Nova	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16
7 - Vitalatte (fervido)	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
8 - Clarice (fervido)	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
9 - Boa Nova (fervido)	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14

Tabela 14 – pH das amostras de Leite UHT (1, 2 e 3), pasteurizado não fervido (4, 5 e 6) e fervido (7, 8 e 9) em função do tempo (horas) de armazenamento após a abertura da embalagem. As amostras fervidas foram aquecidas ao ponto de fervura por 2 minutos em fogo doméstico.

Amostras	Tempo de Conservação (h)				
	0	24	48	72	96
1 - Nestlé	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
2 - Elegê	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
3 - Carrefour	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
4 - Vitalatte	6,7	6,7	6,7	6,7	6,6
5 - Clarice	6,7	6,4	6,3	6,1	6,0
6 - Boa Nova	6,7	6,7	6,6	6,6	6,5
7 - Vitalatte (fervido)	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
8 - Clarice (fervido)	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
9 - Boa Nova (fervido)	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7

Como pode ser evidenciado através dos resultados apresentados nas tabelas, as amostras de leite 4, 5 e 6, que são os leites pasteurizados não fervidos, apresentaram aumento no teor de acidez e consequentemente diminuição do pH, com grande atenção para a amostra 5, que teve uma variação considerável em relação as das outras amostras. Isto corrobora o fato de que o leite pasteurizado ainda deve ser fervido por segurança e não é totalmente recomendado o armazenamento por períodos prolongados quando não fervidos, superiores a 48 horas, sendo ideal o consumo imediato após aberto.

As amostras 1, 2 e 3, que são as de leite UHT e as amostras 7, 8 e 9, que são as amostras de leite pasteurizado fervidos não apresentaram alteração ao longo do tempo, a fervura fez com que o leite pasteurizado resistisse por mais tempo ao tempo de prateleira, apesar dos fabricantes dizerem que não é mais necessário a fervura. O leite UHT, como era esperado devido ao seu processo de ultrapasteurização, não demonstrou qualquer tipo de alteração físico-química, sugerindo nenhuma ação de bactérias (Fonseca *et al*, 2000), comprovando que ele é um tipo de produto totalmente seguro para o consumo humano, mesmo depois de dias aberto na geladeira.

Existem alguns relatos de que o leite possui bactérias benéficas para saúde, como o lactobacilos, mesmo em quantidades bem pequenas se comparado a outros alimentos ricos destas bactérias, como o queijo e o leite fermentado. Essas bactérias resistem à temperatura de pasteurização, porém ao ferver o leite para o consumo, estas bactérias morrem, pois a temperatura de 100°C da fervura é capaz de eliminá-las do leite, ou seja, o leite acaba não se tornando uma fonte desse tipo de bactéria que é benéfica para a saúde humana (Vidal-Martins, 2005).

Comparando os resultados do presente trabalho com o de Paula *et al.* (2010), ambos mostraram que após aberto o leite está totalmente próprio para o consumo conforme os resultados físico-químicos apresentados, pois a embalagem fechada garante a proteção total se armazenado adequadamente conforme instrução do fabricante, porém após cerca de 48 horas após aberto, o leite pasteurizado começa a se tornar inadequado para o consumo devido à alterações nos resultados de pH e índice de acidez, a não ser que seja fervido, diferentemente do leite UHT que mesmo não sendo fervido, se mantém próprio para o consumo em períodos de até 96 horas desde sua abertura, como o presente trabalho evidenciou.

Comparando os resultados do presente trabalho com o de Luz *et al.* (2010), ambos mostraram que o leite pasteurizado estudados não estavam com contagem de bactérias elevadas, evidenciado pela análise microbiana de Luz *et al.* (2010) e pelo resultado baixo de índice de acidez do presente trabalho.

A legislação imposta pelo MAPA, com a IN Nº 62/2011 e a portaria 370/1997, garante uma qualidade mínima para a comercialização do leite cru, pasteurizado e UHT, assim garantindo que se seguidas as normas, o leite não apresentará qualquer tipo de contaminação ou alterações físico-químicas no ato da compra do produto no comércio, garantindo a saúde do consumidor para o consumo do leite.

5 CONCLUSÃO

Tanto no leite pasteurizado quanto no leite UHT podem ocorrer problemas quanto a qualidade, pois ambos são originados da mesma matéria prima, o leite cru.

Hoje pode-se considerar que o leite pasteurizado está mais seguro de se consumir do que há alguns anos atrás, sendo até possível consumi-lo sem a necessidade de ferver em um prazo curto, cerca de até 24 horas, porém após um período superior à 48 horas já apresenta evidências de degradação por bactérias. Então para um consumo mais seguro, há a necessidade de se ferver o leite antes de consumi-lo, como mostraram as análises físico-químicas.

O leite UHT por ter um processamento mais eficaz contra microrganismo, se torna um tipo de leite bem mais seguro para o consumo que o pasteurizado pois mesmo sem ser fervido, manteve as suas características físico-químicas.

Mesmo com o tratamento térmico em temperaturas mais elevadas e com a adição de estabilizantes, os resultados não evidenciaram ser o leite UHT de qualidade inferior ao leite pasteurizado, como é bastante relatado pelo conhecimento popular, e nem ser um leite menos saudável por “possuir química”.

BIBLIOGRAFIA

ABLV. **Associação Brasileira de Leite Longa Vida**. Estatísticas. Disponível em: <www.ablv.org.br>. Acesso em: Dezembro de 2014

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3a Ed., Washington; 1992. 1219p.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. **Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 645-652, jul./set. 2005

BORGES, M. F.; RENATA, T. N.; PEREIRA, L. L. **Perfil de contaminações por Staphylococcus e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho**. Ciência Rural, 38(5), agosto, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa no 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: Dezembro de 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa Nº 62 de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da União, 31 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: Dezembro de 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 370, de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT)**. Diário Oficial da União Brasília, , n. 172, 8 set. 1997. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002**. Diário Oficial da União, 20 set. 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde – **ANVISA**. Disponível em: <www.portal.anvisa.gov.br>. Acessado em: Dezembro de 2014

BRASIL. Portaria 146 de 07/03/1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT**. Brasília, DF: [s.n.], 1996. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acessado em: Dezembro de 2014

CASTRO, V.S.; NASCIMENTO, V.L.V.; OLIVEIRA, D.S.V.; SOARES, M.J.S. **Pesquisa de Coliformes e Staphylococcus coagulase positivo em queijo minas frescal comercializado em Teresina – PI**. In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa/PB, 2007. Trabalho apresentado ao 2º Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa, PB, 2007.p. 1-9p.

COELHO, P. S.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V.; SIQUEIRA, A. P. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2001.

CULTIVANDO. **Qual a diferença entre o leite A, B, C e UHT?** <http://www.cultivando.com.br/cotidiano/tipos_de_leite.html>, 2011. Acessado em: Dezembro de 2014

FARINA, Elizabeth M.M.Q.; AZEVEDO, Paulo F.; SAES, Maria S.M. **Competitividade: mercado, estado e organizações**. São Paulo: Singular. 1997.

FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Ed. 175 p. 2000.

FOLHA. **Debate opõe pasteurizado e longa vida**. <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro>>, 2002. Acessado em: Dezembro de 2014

LEITE JR, A.F.S.; TORRANO, A.D.M.; GELLI, D.S. **Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000

LUZ, D. F.; BICALHO, F. A.; OLIVEIRA, M. V. M.; SIMÕES, A. R. P. **Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense**. Dourados, v.4, n.14, p.367-374, 2010

MACIEL, J.F.; CARVALHO, E.A.; SANTOS, L.S., ARAÚJO, J.B.; NUNES, V.S. **Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga / BA**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.9, n.3, p.443-448, 2008.

METHROM PENSALAB. **Practical aspects of modern titration**. <<http://www.methrom.com/br>>, 2015. Acessado em: Janeiro de 2015

METTLER TOLEDO <<http://br.mt.com/br>> Acessado em: Janeiro de 2015

MILKPOINT. <<http://www.milkpoint.com.br>>, 2014. Acessado em: Dezembro de 2014

MILKPOINT. **Leite UHT francês chega aos mercados brasileiros**. <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/leite-ugt-frances-chega-aos-mercados-brasileiros-82211n.aspx>>, 2013. Acessado em: Dezembro de 2014

NERO, L. A.; MATTOS M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. **Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

OLIVEIRA AJ, CARUSO J. A. B. **Leite- Obtenção e qualidade dos produtos fluídos e Derivados**. 2 ed. Piracicaba-SP: Editora Fealq, 1996.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; NILMA, C.; ALMEIDA, A. M. P. **Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil.** Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, 34(02), Mar-Abril, 2001.

PARMALAT. **A história do leite.** <<http://www.parmalat.pt>>, 2008. Acessado em: Dezembro de 2014.

PAULA P. P.; CARDOSO, C. E.; RANGEL, M. A. C. **Análise Físico-química do Leite Cru Refrigerado Proveniente das Propriedades Leiteiras da Região Sul Fluminense.** Revista Eletrônica TECCEN, Vassouras, v. 3, n. 4, p. 7-18, out./dez, 2010.

PRATA, L.F. **Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação.** Higiene Alimentar, v. 12, p. 10 – 15, 1998.

REZENDE, N. C. M.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.. **Ocorrência de microrganismos indicadores em leite UHT (“ultra-high-temperature”)** milk. R. Bras. Cienc.Vet., Niteroi, v. 7, n. 1, p. 58-60, jan./abr. 2000.

ROSENTHAL, I. **Milk and dairy products: properties and processing.** Weinheim, New York: VCH Publisher Inc., 1991.

RUBEZ, J. **O leite nos últimos 10 anos.** Ver em: <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_093.htm>, Acesso em: Dezembro de 2014.

SALVADOR, F. C. BURIN, A. S. FRIAS, A. A. T. OLIVEIRA, F. S. FAILA, N. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região.** Revista F@pciência, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v.9, n. 5, p. 30 – 41, 2012.

SANTOS, M.V. **Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite.** In: SANTOS, M.V., DURR, J.W., CARVALHO, M.P. **O Compromisso com a Qualidade do Leite. Passo Fundo.** Editora UPF, 2004, v.1, p. 269-283.

SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. **Isolation and serological identification of enteropathogenic Escherichia coli in pasteurized milk in Brazil.** Revista de Saúde Pública, São Paulo, 35(4), Ago., 2001.

TETRA PAK. **History of Tetra Pak.** < <http://www.tetrapak.com/about-tetra-pak/the-company/history/ourhistory>>, 2013. Acessado em: Dezembro de 2014

TETRA PAK. **Dairy processing handbook.** Lund, Sweden, 1996. 1 CD.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia.** 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIDAL-MARTINS, A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. **Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura.** Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

WASTRA P, JENNESS R (1984). **Química y física lactológica.** Ed. Acribia, Zaragoza. 423 p.

ANEXO 1 - MÉTODO REALIZADO POR LUZ *et al.* (2010)

Foram obtidas 30 amostras de leite sendo 10 de cada tipo (cru formal, cru informal e pasteurizado), para as análises microbianas, seguindo todas as exigências da legislação quanto a obtenção, transporte e armazenamento. As amostras de leite pasteurizados foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Aquidauana/MS e de Campo Grande/MS, as de leite cru formal em propriedades legalizadas no estado de MS e as de leite cru vendidas de maneira informal foram adquiridas em residências onde as mesmas são comercializadas (Luz *et al.*, 2010).

A contagem de células somáticas foi executada em triplicata utilizando-se um aparelho digital SCC Milk Test® igual ao da figura 7, utilizando-se três tiras colorimétricas para cada amostra de leite. Uma gota de cada amostra de leite foi adicionada à tira e posteriormente, três gotas da solução ativadora específica do kit. Após o período de tempo de reação recomendada pelo kit, as tiras foram inseridas no leitor digital de células somáticas e a contagem foi determinada eletronicamente (Luz *et al.*, 2010).

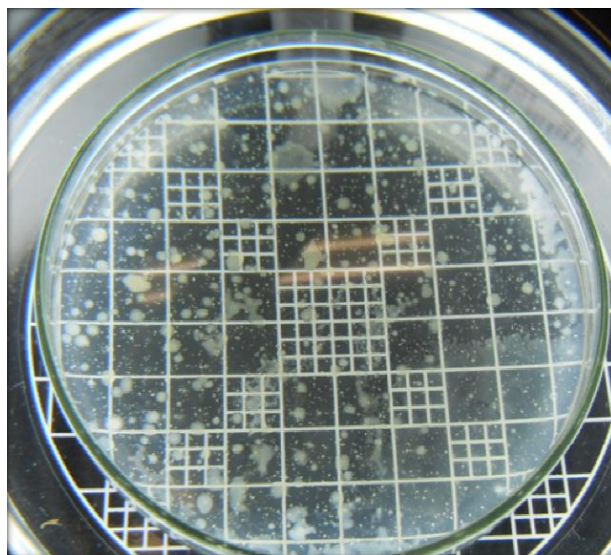


Fonte: PortaCheck (2014)

Figura 7 - SCC Milk Test®

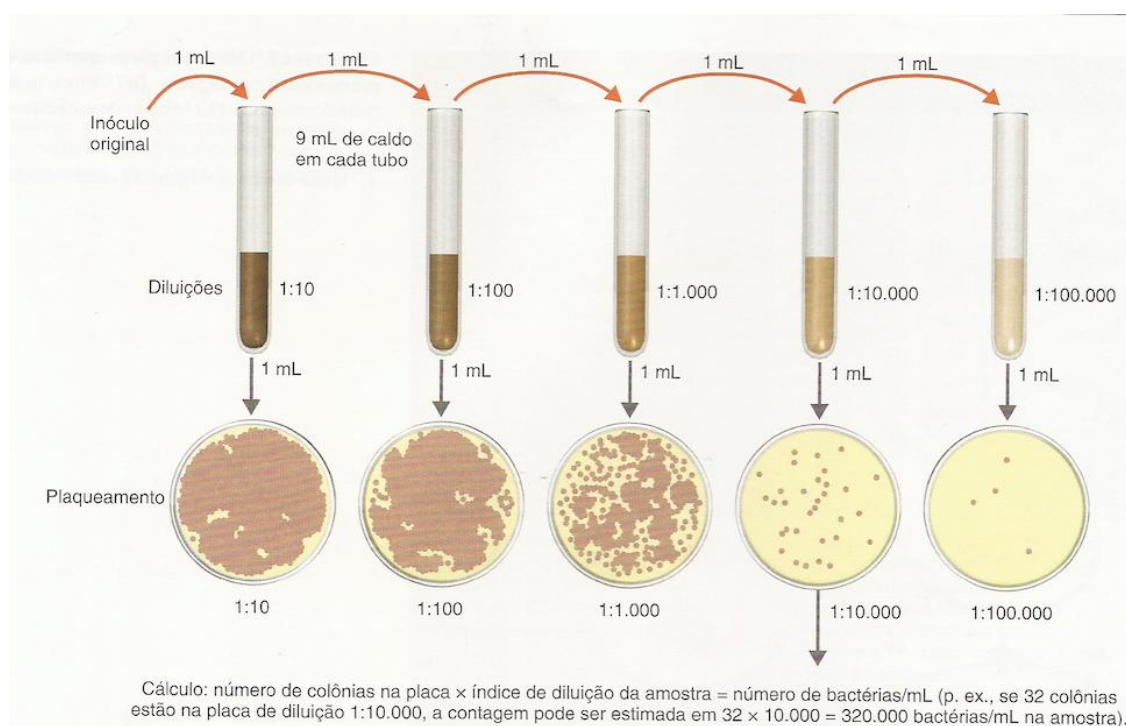
A contagem bacteriana total (CBT) foi feita de acordo com a IN 62/2011 (Brasil, 2011) em duplicata em meio ágar (PCA – MERCK) para contagem, após a incubação à 37°C por 24 a 48 horas. O cálculo da CBT foi realizado em contador de colônias digital em placas com mais de 25 colônias (Figura 8) e posteriormente, a

média das contagens de colônias no meio utilizado multiplicada pelo inverso da diluição, resultou no número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL do produto (Figura 9) (Luz *et al.*, 2010).



Fonte: Luz *et al.* (2010)

Figura 8 - Placa de Petri sobre contador de colônias digital para determinação da CBT. As manchas circulares indicam as UFC



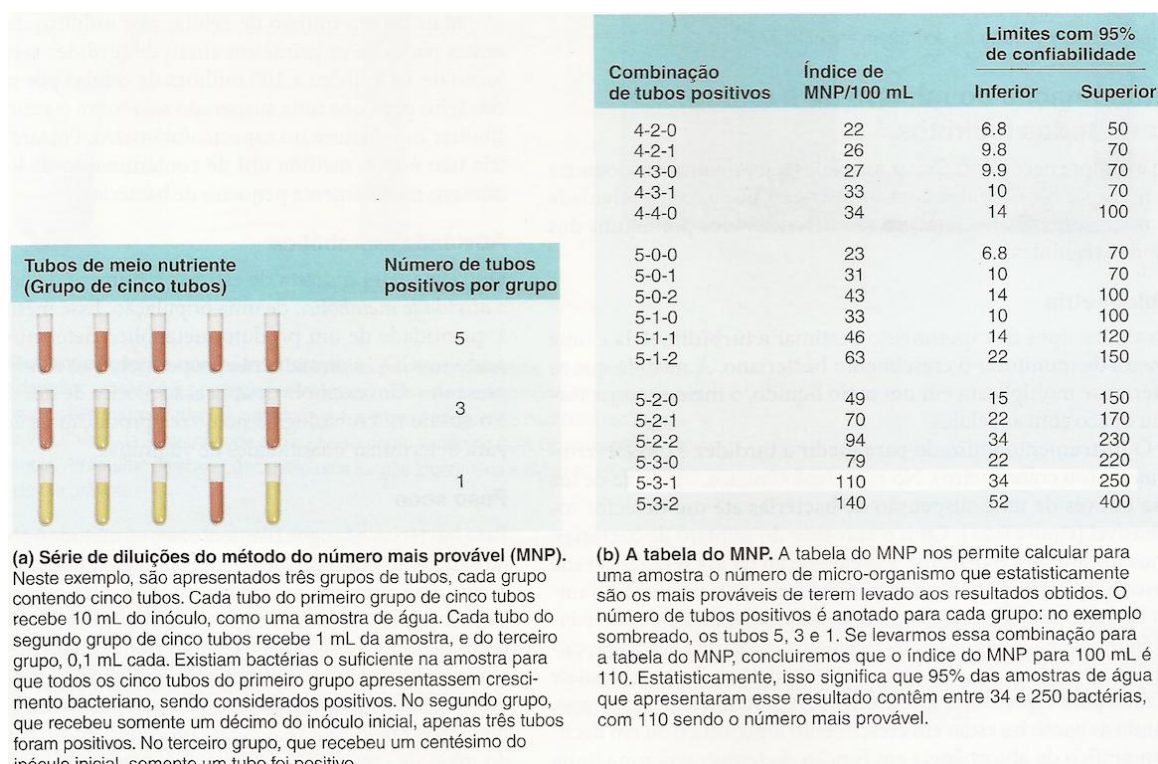
Fonte: Tortora *et al.* (2012)

Figura 9 - Diagrama da técnica de diluição seriadas e cálculo estimado da CBT

Para determinar o coliformes totais, se utilizou a técnica de tubos múltiplos em número mais provável (NMP) (Figura 10). Assim, fez-se a diluição 1:10,

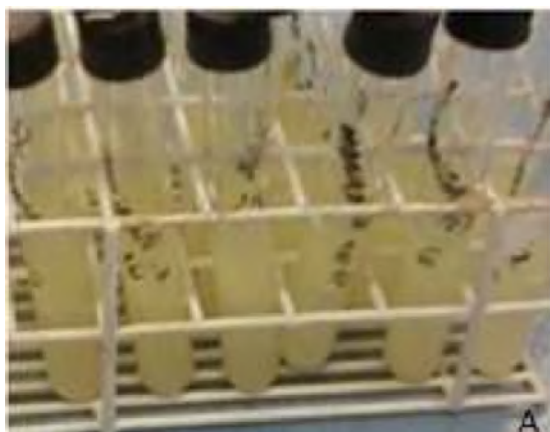
homogeneizando-se 25 mL de leite com 225 mL de água peptonada a 1,0% e as diluições seriadas (1:100 e 1:1000); em seguida, inoculou-se 1 mL de cada diluição em triplicata. O meio utilizado foi o caldo laurilsulfatotriptose (LST) e incubou-se a 35°C de 24 a 48 horas. Dos tubos positivos, com turvação e formação de gás nos tubos de Durham (Figura 11), fez-se a confirmação com Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VBB) nas mesmas condições de tempo e temperatura, sendo considerados positivos para *Escherichia coli* os tubos que apresentaram turbidez e formação de gás (Luz *et al*, 2010).

A quantificação de coliformes termotolerantes foi efetuada através da técnica de tubos múltiplos e por identificação da *E. coli*. Os tubos com VBB positivos foram replicados para tubos com caldo *E. coli* suplementado com 4 metil umbeliferil β -D glucoronídeo (EC-MUG), utilizado para determinar de forma simultânea, a presença de coliformes termotolerantes e *E. coli*. Após a incubação a 44,5°C durante 24 horas, registrou-se o número dos tubos com crescimento positivo para a presença de coliformes termotolerantes (turbidez e gás) e determinou-se o NMP/mL. Todos os tubos de EC-MUG com desenvolvimento em 24 horas de incubação foram observados sob luz ultravioleta a 365nm em uma cabine escura, considerando-se positivos para *E. coli* os que apresentaram fluorescência azul (Luz *et al*, 2010).



Fonte: Tortora *et al*. (2012)

Figura 10 - Método do número mais provável (NMP)



Fonte: Luz *et al.* (2010)

Figura 11 - Tubos positivos para presença de Coliformes Totais (A) e termotolerantes (B)

ANEXO 2 - MÉTODO REALIZADO POR SALVADOR *et al.* (2012)

Seguindo a metodologia descrita na IN N° 62/2003 (Brasil, 2003), fez-se, em duplicata, a diluição 1:10, homogeneizando-se 25 mL de leite com 225 mL de água peptonada a 1,0% tamponada e incubou-se entre 16 e 20 horas a 36°C. Posteriormente, pipetou-se alíquotas desta diluição em tubos de ensaio contendo caldo Rappaport Vassiliadis e em tubos contendo caldo Selenito Cistina. Ambos os tubos com os meios foram incubados a 41°C em banho-maria com agitação entre 24 e 30 horas. A partir desses caldos, foram feitos repiques em 2 placas de Petri com meio Ágar BPLS para cada tubo de caldo. Essas placas foram inoculadas entre 35 e 37°C por 18 a 24 horas (Salvador *et al.*, 2012).

As colônias selecionadas nas placas foram testadas com teste de oxidase, além de confirmação bioquímica. Os resultados positivos foram testados com soro anti-*Salmonella* polivalente “O” e emitidos como presença ou ausência para *Salmonella* spp (Salvador *et al.*, 2012)

ANEXO 3 - MÉTODO REALIZADO POR PAULA *et al.* (2010)

A determinação de acidez foi por titulação com solução de Hidróxido de sódio 0,1M (NaOH) e fenolftaleína 1% como indicador. O teste de estabilidade foi feita com solução de alizarol 78%. Para a detecção de resíduos de antibióticos, foram utilizados o kit teste da empresa DSM (Delvotest®) e encubados em estufa a 64°C por 3 horas. A Crioscopia foi feita pelo crioscópio eletrônico microprocessado (modelo KO-7000 da CAPI). O pH foi determinado com pHmetro com eletrodo de vidro combinado (Digimed DM-22). A densidade foi através de pesagem com um balão de 10 mL em balança analítica, calculando-se pela fórmula da densidade ($D=M/V$). O extrato seco total e desengordurado foi por cálculos matemáticos no disco de Ackermann. A fosfatase alcalina foi determinado com o kit da empresa DIASYS. A peroxidase e o teor de peróxido foram determinadas com solução de guaiacol 1% da TEC LAB e peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) a 10 volumes. A investigação da presença de bicarbonatos e outros alcalinos foram com solução ácido rosólico 1% da TEC LAB e etanol. A investigação da presença de amido foi com solução de lugol da CAP LAB. A análise de cloretos foi feita com solução de cromato de potássio 5% e nitrato de prata 10%. Para a presença de sacarose utilizou-se ácido clorídrico P.A. como reagente. Para a presença de fenol utilizou-se ácido clorídrico P.A. e cloreto férrico 2,5% (Paula *et al.*, 2010).